



Title	新興・再興ウイルス感染症に対する広域的治療薬の創製研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	上村, 健太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14836号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85676
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentaro_Uemura_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 上村 健太郎

学位論文題名

新興・再興ウイルス感染症に対する広域的治療薬の創製研究

近年、世界では様々な新興・再興ウイルス感染症が流行しており、2019年11月に発生し、パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)感染症(COVID-19)は、人々の健康のみならず、経済活動にも多大な影響を及ぼしている。また、デング熱を引き起こすデングウイルス(DENV、1型~4型の血清型が存在)は、フラビウイルス属のウイルスであり、蚊等の節足動物に媒介されるため、地球温暖化による流行地域の拡大が懸念されている。世界中で治療薬の研究開発が遂行されているが、現在までに完全に有効な治療法は確立されていないことから、治療薬の開発が望まれている。

SARS-CoV-2やDENV等のRNAウイルスは、自身のゲノムを複製する際にRNA依存性RNAポリメラーゼ(RdRp)を介した核酸合成を行う。RdRpのRNA合成機能はウイルス間で共通しているため、RdRpに作用するヌクレオシドアナログ(NA)は、様々なウイルスに対して有効にはたらくことが期待される。RNAウイルスに対するNAとしては、COVID-19治療薬として開発されたレムデシビルや、C型肝炎治療薬のソホスブビル等が知られており、これらはウイルスのRdRpに作用し、ウイルスRNAの合成伸長を阻害することで、ウイルスの増殖を抑制する。実際に、レムデシビルはコロナウイルスだけでなく、エボラウイルス等、様々なRNAウイルスに対して抗ウイルス活性を示すことが知られている。本研究では、創薬科学研究教育センターが保有する、ヌクレオシドを母核とする化合物ライブラリーに着目し、DENVをはじめとするフラビウイルスやコロナウイルス等に対して、広域的に抗ウイルス活性を示すNAを探索・開発することを目的とした。

本研究開始に際し、化合物スクリーニングを実施するために、DENV2を用いた*in vitro*薬効評価系を構築した。同時に、DENVと同じフラビウイルス属に属し、ヒトに重篤な疾患を引き起こすジカウイルス(ZIKV)、黄熱ウイルス(YFV)、日本脳炎ウイルス(JEV)、ウエストナイルウイルス(WNV)についても、*in vitro*薬効評価系の構築を進めた。初期スクリーニングとして、ウイルス増殖に伴い出現する培養細胞の細胞変性効果(CPE)をウイルス感染の指標とし、CPEの抑制を測定することで化合物によるウイルス増殖阻害活性を調べた。薬効評価系構築後、創薬科学研究教育センターの化合物ライブラリーにある753個のNAについて抗DENV2活性を調べた結果、53化合物が強い抗DENV2活性を示した。次に、DENVの他の血清型を含む上記のフラビウイルスに対する薬効評価を実施したところ、8化合物が全てのウイルスに対して強い抗ウイルス活性を示した。これらの中から、HUP1108(5-Hydroxymethyltubercidin, HMTU)及びHUP0797(2-Thiouridine, s2U)をHit化合物に選抜し、詳細な解析を実施することとした。

フラビウイルスは、一本鎖プラス鎖RNA[ssRNA(+)]をゲノムに持つウイルスであることから、同じくssRNA(+))をゲノムに持つコロナウイルス(HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、SARS-CoV-2)に対するHMTUの抗ウイルス活性を調べた。ウイルスRNAの複製を調べるqRT-PCR assay、子孫ウイルスの感染力価を調べるTCID₅₀ assay、ウイルスタンパク質発現を調べる免疫蛍光染色法を構築し、抗ウイルス活性を評価したところ、HMTUはコロナウイルスのRNA複製、タンパク質産生、子孫ウイルス産生を阻害することがわかった。続いて、どのステップでSARS-CoV-2の増殖を抑制しているのかを調べる

ために、HMTUの添加タイミングを変えた Time-of-Addition 試験を実施した。その結果、HMTUはウイルス感染過程の後期に作用し、ウイルスの複製を阻害することが明らかとなった。

一方、s2Uについても、フラビウイルスをはじめ、同じく ssRNA(+)をゲノムに持つチクングニヤウイルス (CHIKV) 及びコロナウイルスに対する抗ウイルス活性を調べた。その結果、s2Uはフラビウイルス、CHIKV 及びコロナウイルスの RNA 複製を阻害し、ウイルスタンパク質産生も阻害した。次に、ssRNA(+)ウイルス以外のウイルスに対する抗ウイルス活性を調べた。その結果、s2Uは評価した全てのマイナス鎖 RNA ウイルス及び DNA ウイルスに対して抗ウイルス活性を示さなかった。これらの結果から、s2Uは ssRNA(+)ウイルスに対して特異的かつ広域的に抗ウイルス活性を示す NA であることが示唆された。続いて、s2Uの作用点を調べるために、DENV2を用いた薬剤耐性ウイルス分離試験を実施し、s2Uを高濃度で添加しても CPEを示すようなウイルスの遺伝子を解析したところ、RdRp領域に G605Vの1アミノ酸置換が認められた。G605Vの耐性寄与度を確認するために、変異を有する組換え DENV2を作製し、抗ウイルス活性を調べたところ、野生型の組換え DENV2に対しては抗ウイルス活性を示したが、G605Vウイルスに対しては抗ウイルス活性を示さなかった。これらの結果から、上記 G605Vが耐性獲得責任部位であり、s2Uの標的部位は RdRp であることが示唆された。

NAは、細胞に取り込まれた後にリン酸化され、5'-三リン酸 (TP) 体となることで抗ウイルス活性を発揮することが知られている。そこで、HMTU及びs2Uの5'-TP体 (HMTU-TP及びs2UTP)とZIKVのRdRpを用いて、ウイルスRdRpによるRNAの合成伸長を阻害するか調べた。その結果、HMTU-TP、s2UTPともに、ZIKVのRdRpによるRNA合成伸長を阻害することを見出した。また、阻害メカニズムとして chain termination が考えられたが、決定付けるには追加検証が必要である。

HMTU及びs2Uの *in vivo* 薬効を確認するために、SARS-CoV-2感染マウスモデル及びDENV2感染マウスモデルを構築した。マウスにウイルスを感染させ、HMTU及びs2Uを静脈内投与または経口投与により処置した結果、Vehicle投与群に対して、化合物投与群でマウス体内におけるウイルス増殖抑制が認められた。また、化合物投与群において、ウイルス感染マウスの致死抑制効果が認められた。この結果から、HMTU及びs2Uは *in vivo* においても抗ウイルス活性を示すことが示唆された。

上述のように、本研究において、ssRNA(+)ウイルスに対して広域的に強い抗ウイルス活性を示す HMTU 及び s2U を見出した。DENV や SARS-CoV-2 をはじめ、新興・再興ウイルス感染症に対する完全に有効かつ安全な治療法は確立されていないため、本研究成果は新たな治療薬の研究開発に大いに貢献できると考えられる。今後、さらなる最適化研究により、より高活性かつ安全な化合物へと仕上げることで、新興・再興ウイルス感染症治療薬の開発に貢献できると期待される。